

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-206071

(43) 公開日 平成9年(1997)8月12日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/02			C 1 2 N 9/02	
C 0 2 F 3/34			C 0 2 F 3/34	Z
C 1 1 D 3/386			C 1 1 D 3/386	
C 1 2 N 1/20			C 1 2 N 1/20	A
// (C 1 2 N 9/02				

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-12977	(71) 出願人	391032071 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ NOVO NORDISK AKTIE SELSXAB デンマーク国, デーヨー-2880 バグスバ エルト ノボ アレ (番地なし)
(22) 出願日	平成8年(1996)1月29日	(72) 発明者	愛知後 貴 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内
		(72) 発明者	大野 律子 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外5名)

(54) 【発明の名称】 バクテリア由来の酸化酵素

(57) 【要約】

【課題】 新規なポリフェノールオキシダーゼとその生産微生物及び用途の提供。効率の良いポリフェノールオキシダーゼの生産方法の提供。

【解決手段】 バクテリアが生産するポリフェノールオキシダーゼとその生産微生物及び用途。該バクテリアを培養することを特徴とするポリフェノールオキシダーゼの生産方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バクテリア由来のポリフェノールオキシダーゼ。

【請求項2】 下記の性質を有する請求項1記載のポリフェノールオキシダーゼ。

(1) 作用

ポリフェノールを酸化する。

(2) 至適反応pH

pH7付近に至適反応pHを有する。

(3) 至適反応温度

60～80℃に至適反応温度を有する。

(4) 分子量

GFC分析により測定した分子量が約51,000。

【請求項3】 バチルス (*Bacillus*) 属細菌由来の請求項1または2記載のポリフェノールオキシダーゼ。

【請求項4】 バチルス (*Bacillus*) 属細菌がバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、またはバチルス・ナットー (*Bacillus natto*) である請求項3記載のポリフェノールオキシダーゼ。

【請求項5】 バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) SD3003 (受託番号FERM P-15383) から得ることのできる請求項1または2記載のポリフェノールオキシダーゼ。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族、ハロゲン化フェノール化合物、または芳香族アミン化合物の処理方法。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする着色物質の処理方法。

【請求項8】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする着色排水の処理方法。

【請求項9】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする、微生物またはウィルスの処理方法。

【請求項10】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする紙、パルプ、または繊維の処理方法。

【請求項11】 洗浄剤、洗剤、または界面活性剤と共に用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

【請求項12】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを含むことを特徴とする洗剤組成物。

【請求項13】 ペルオキシダーゼ作用を有する物質と共に用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

【請求項14】 酸化剤として空気、酸素、オゾン、過

酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体または過酸を、単独で、または複数組み合わせることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

【請求項15】 オキシダーゼ及びその基質と共に用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

【請求項16】 バチルス (*Bacillus*) 属細菌を培養することを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの製造方法。

【請求項17】 バチルス (*Bacillus*) 属細菌がバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、またはバチルス・ナットー (*Bacillus natto*) である請求項16記載のポリフェノールオキシダーゼの製造方法。

【請求項18】 バチルス (*Bacillus*) 属細菌がバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) SD3003 (受託番号FERM P-15383) またはその変異株である請求項16記載のポリフェノールオキシダーゼの製造方法。

【請求項19】 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを生産するバチルス (*Bacillus*) 属細菌。

【請求項20】 バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) SD3003 (受託番号FERM P-15383)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、バクテリアが生産するポリフェノールオキシダーゼとその生産微生物及び用途に関する。更に詳しくは、ポリフェノールオキシダーゼによる着色物質の酸化処理やポリフェノール含有物の酸化処理、洗浄のための、新たな酵素供給源を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、ポリフェノール酸化作用を持つ酵素としてポリフェノールオキシダーゼやラッカーゼが知られている。そして、これらの酵素の生産菌として、担子菌類、不完全菌類等の糸状菌が知られているのみであった。一方、ポリフェノール酸化酵素の利用方法について活発に研究開発が行われており、例えば紙・パルプ分野での脱リグニンについては、WO94-29510などに報告があり、また、洗濯などでの洗浄操作での漂白のための利用については、WO91-05839、EP91610032、DE4008894、特開昭64-60693などに記載されている。しかしながら、従来のポリフェノールオキシダーゼやラッカーゼの生産菌は担子菌類、不完全菌類等の糸状菌であるため、概して大量培養は困難であり、また培養時の生育速度も高くはない。また、目的酵素の生産性を向上させるために変異株の取得や遺伝子操作を行う場合には、これらの菌類の持

複雑な生活環や、イントロンの存在等の遺伝子構造の複雑さのため、バクテリアに比べ多大な労力を要するものが多い。このような理由から、安定かつ安価に菌類によってポリフェノールオキシダーゼを大量生産することは困難であり、産業上の利用に供するためにはバクテリア由来のポリフェノールオキシダーゼが望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、バクテリアが生産するポリフェノールオキシダーゼとその生産微生物及び用途を提供し、本酵素を着色物質の酸化処理やポリフェノール含有物の酸化処理、洗浄に用いるための、新たな酵素供給源を提供するものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】ポリフェノール酸化作用を持つ酵素としてポリフェノールオキシダーゼやラッカーゼが知られている。そして、これらの酵素の生産菌として、担子菌類、不完全菌類等の糸状菌が知られているのみであった。そこで、本発明者らはポリフェノール物質の酸化を触媒する菌体外生産物を広範なバクテリアにおいて鋭意探索した。その探索は極めて困難であったが、ついに、バチルス (*Bacillus*) 属に属する菌株が目的の酵素を菌体外に生産することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち本発明は以下のものを提供するものである。

- 1) バクテリア由来のポリフェノールオキシダーゼ。
- 2) 下記の性質を有する前記 1) 記載のポリフェノールオキシダーゼ。

(1) 作用

ポリフェノールを酸化する。

(2) 至適反応 pH

pH 7 付近に至適反応 pH を有する。

(3) 至適反応温度

60~80℃に至適反応温度を有する。

(4) 分子量

GFC 分析により測定した分子量が約 51,000。

【0006】3) バチルス (*Bacillus*) 属細菌由来の前記 1) または 2) 記載のポリフェノールオキシダーゼ。

4) バチルス (*Bacillus*) 属細菌がバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、またはバチルス・ナットー (*Bacillus natto*) である前記 3) 記載のポリフェノールオキシダーゼ。

5) バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) SD3003 (受託番号 FERM P-15383) から得ることのできる前記 1) または 2) 記載のポリフェノールオキシダーゼ。

【0007】6) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特

徴とする、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族、ハロゲン化フェノール化合物、または芳香族アミン化合物の処理方法。

7) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする着色物質の処理方法。

8) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする着色排水の処理方法。

9) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする、微生物またはウィルスの処理方法。

10) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする紙、パルプ、または繊維の処理方法。

11) 洗浄剤、洗剤、または界面活性剤と共に用いることを特徴とする前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

【0008】12) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを含むことを特徴とする洗剤組成物。

13) ペルオキシダーゼ作用を有する物質と共に用いることを特徴とする前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

14) 酸化剤として空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体または過酸を、単独で、または複数組み合わせることを特徴とする前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

15) オキシダーゼ及びその基質と共に用いることを特徴とする前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの使用法。

【0009】16) バチルス (*Bacillus*) 属細菌を培養することを特徴とする前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼの製造方法。

17) バチルス (*Bacillus*) 属細菌がバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、またはバチルス・ナットー (*Bacillus natto*) である前記 16) 記載のポリフェノールオキシダーゼの製造方法。

18) バチルス (*Bacillus*) 属細菌がバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) SD3003 (受託番号 FERM P-15383) またはその変異株である前記 16) 記載のポリフェノールオキシダーゼの製造方法。

【0010】19) 前記 1)~5) のいずれか一項に記載のポリフェノールオキシダーゼを生産するバチルス (*Bacillus*) 属細菌。

20) バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) SD3003 (受託番号 FERM P-15383)。

【0011】以下に本発明について詳細に説明する。

(生産菌) 本発明のポリフェノールオキシダーゼを得るために用いるバチルス属に属する菌株は該ポリフェノールオキシダーゼ生産能を有していれば良く、それ以外は特に制限はないが、例えばバチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alcalophilus*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・ナットー (*Bacillus natto*)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumil*

us)、バチルス・スファエリカス (*Bacillus sphaericus*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)などが挙げられるが、好ましくはバチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・ナットー (*Bacillus natto*)、特に好ましくはバチルス・リケニホルミス SD3003 (*Bacillus licheniformis* SD3003) (工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15383として寄託)を用いる。本発明での代表的な菌株について、形態観察や、生理的性状試験・測定などの結果を下記に示す。

【0012】

項目	結果
形態	桿菌
グラム染色性	+
孢子	+
形	楕円形
位置	中立～亜端立
孢子嚢	非膨出
運動性	+
酸素に対する態度	通性嫌気性
カタラーゼ	+
嫌気下での生育	+
V-P反応	+
V-PプロスのpH	5.2
グルコースからの酸の生成	+
グルコースからのガスの生成	—
ゼラチンの液化	+
デンプンの分解	+
クエン酸塩の利用	+
プロピオン酸塩の利用	+
卵黄反応	—
硝酸塩の還元	+
pH6.8での生育 (ニュートリエントプロス)	+
pH5.7での生育	+
5%NaCl存在下での生育	+
7%NaCl存在下での生育	+
10℃での生育	—
30℃での生育	+
55℃での生育	+
65℃での生育	—
菌体内DNAのGC含量 (モル%) *	46

* HPLC法によった。

【0013】これらの結果と、文献 ("Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Vol.2 (1986) Williams & Wilkins 及び "The Genus Bacillus" (1973) U.S. Department of Agriculture) を参考にして、本菌株はバチルス・リケニホルミス SD3003 (*Bacillus licheniformis* SD3003) と命名された。

【0014】(酵素の調製) 本発明のポリフェノールオキシダーゼは、前記のバチルス属に属する菌株及びその変異株を培養して得られる他、遺伝子操作菌を利用して調製することも可能である。すなわち、該ポリフェノール

【0014】(酵素の調製) 本発明のポリフェノールオキシダーゼは、前記のバチルス属に属する菌株及びその変異株を培養して得られる他、遺伝子操作菌を利用して調製することも可能である。すなわち、該ポリフェノール

ルオキシダーゼをコードするDNAが宿主生物での酵素発現機能を有する適当なプロモーター、及びオペレーター、ターミネーターDNAと共に、宿主生物中でベクターを複製するための複製開始点を有するDNAベクターに挿入された発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞、または該ポリフェノールオキシダーゼをコードするDNAが宿主生物での酵素発現機能を有する適当なプロモーター、及びオペレーター、ターミネーターDNAと共に、宿主細胞DNAにインテグレーションせしめることで形質転換された宿主細胞を、ポリフェノールオキシダーゼの発現できる条件のもとに培養し、さらにポリフェノールオキシダーゼを培地から回収する方法によっても生産される。

【0015】本発明のポリフェノールオキシダーゼをコードするDNA断片の取得のためには、例えば本発明の菌株からのcDNAまたはゲノムライブラリを分離源とし、本発明のポリフェノールオキシダーゼのアミノ酸配列もしくは既知のポリフェノールオキシダーゼのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプローブとして目的のDNA断片を特定するか、または酵素活性を発現するクローンを選択するか、または該ポリフェノールオキシダーゼに対する抗体と反応する蛋白質を生産するクローンを選択するといった常法によって行うことができる。

【0016】本発明のポリフェノールオキシダーゼを得るための培養は、通常用いられる合成培地や有機炭素源及び有機窒素源を含む栄養培地が使用可能である。また、 Cu^{2+} イオンを金属塩として0.001mMから10mM、好ましくは0.01mMから1mMの濃度で添加することが望ましい。また、 Mn^{2+} イオンを金属塩として0.001mMから100mM、好ましくは0.01mMから10mMの濃度で添加することが望ましい。培養温度は20~60℃、好ましくは30~55℃である。また、適当な培養時間は20時間から200時間、好ましくは40時間から150時間である。分泌されたポリフェノールオキシダーゼは培地中から周知の方法で回収できる。この回収手順には、遠心分離もしくはろ過、膜分離により培地から細胞を分離し、例えばイオン交換クロマトグラフィー等によるクロマトグラフィーを行うという一連の手順が含まれる。また、限外ろ過膜を用いる膜濃縮も有効である。また、硫酸等を用いる塩析によっても分離濃縮が可能である。

【0017】(酵素の性質) 本発明のポリフェノールオキシダーゼの代表例であるバチルス・リケニホルミスSD3003由来の酵素は5~9の広いpH範囲で酸化反応を行えるが、好ましくはpH6~8、より好ましくはpH7近辺であり(図1)、中性pH域での酸化反応を触媒するという特長を有する。また、至適温度は60~80℃であり(図2)、さらには、pH7において様々な一定温度で30分間の加熱処理を施した後の活性

は、例えば70℃においてはほぼ100%の残存活性を示す(図3)。さらには、様々なpHのバッファー中で30℃、30分間の処理を施した後の残存活性は、広範囲のpHにおける安定性を示す(図4)。これらの結果は、弱酸性から弱アルカリ性の広範囲のpH域で、中低温の様々な溶液中での酸化反応を保証する。また、GFC分析による分子量は約51,000である。

【0018】また、本発明のポリフェノールオキシダーゼは、従来の酸性側に至適反応pHを有する酵素と共に組み合わせて用いることも可能である。つまり、従来知られている酸性側に至適反応pHを有するポリフェノールオキシダーゼと本発明のポリフェノールオキシダーゼを組み合わせて用いることで、酸性から弱アルカリ性の広範囲のpH域においてポリフェノールオキシダーゼ反応を行うことが可能となる。このような目的で酵素を混合して用いるとき、酸性側に至適反応pHを有するポリフェノールオキシダーゼの活性量と本発明のポリフェノールオキシダーゼの活性量の混合比率は、好ましくは1:10~10:1、より好ましくは1:3~3:1である。このようにして広範囲のpH域においてポリフェノールオキシダーゼ反応を達成するためにも、本発明のポリフェノールオキシダーゼは有用である。

【0019】(活性測定法) 本発明において、ポリフェノール酸化活性の活性測定は20℃において20ppmのシリングアルダジン(syringaldazine)と100mMのBis-Tris-HClバッファー溶液(pH7.0)

(Bis-Trisはドータイト試薬より入手)を含む水溶液中で反応を行い、525nmの吸光度を測定することで行った。そして、1分間に1nmolのシリングアルダジンを酸化する活性量を1munit(以下mUと略す)と定義した。また、本発明のポリフェノールオキシダーゼを用いてポリフェノール含有物の処理を行うときは、10~500mU/mlの活性濃度で使用した。

【0020】(用途) ポリフェノールオキシダーゼの用途としては、例えば、漂白への適用が可能である。ポリフェノール酸化酵素の漂白への利用については、WO91-05839、DE4008894、特開昭64-60693などに記載されている。本発明のポリフェノールオキシダーゼはこうした、洗浄、漂白分野にバクテリア由来の酵素の用途を開くものとして有用である。

【0021】過酸化水素による酸化漂白は洗浄、洗濯において現在広く用いられている。しかしながら、過酸化水素は60℃以下の低温でその漂白力が十分ではない。これを改善するために、過酸前駆体が過酸化水素と共に用いられているが、40℃以下の低温での漂白力は十分ではなく、より効果の高い漂白系が求められている。そのため、様々な酵素的漂白促進方法が従来より提案されている。ここに開示するポリフェノールオキシダーゼを、ペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、マンガニンペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ作用を有

する物質の内の1つもしくは複数と共存させることで、酸化漂白を促進することができ、本発明の有用性は明かである。

【0022】酸化漂白のために広く用いられている過酸化水素は高価な酸化剤であり、そして、洗浄剤にしばしば用いられている過酸化水素前駆体や過酸前駆体、過酸はさらに高価な酸化剤である。また、オキシダーゼとその基質を用いることで過酸化水素を酵素的に生成することも可能だが、こうした過酸化水素発生系もまた高価な酸化剤と考えることができる。ここに開示するポリフェノールオキシダーゼに加えて、従来より酸化漂白のために用いられている酸化剤である空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体、または過酸を、単独で、または複数組み合わせることで、酸化漂白を促進することができる。従って、酸化剤を有効に用いて酸化漂白を達成できる本発明の有用性は明らかである。

【0023】酸化剤の内、過酸化水素前駆体は水に溶解してパーヒドロキシリオンを生成するものである。このような物質には、1水和物もしくは4水和物のパーボレート、パーカーボネート、過ホウ砂、過ピロリン酸ナトリウム、過安息香酸、尿素-H₂O₂反応物、メラミン-H₂O₂反応物、クエン酸過水和物などがあり、特に好ましくはパーボレート、パーカーボネートである。またさらには、過酸化水素前駆体としてオキシダーゼ及びその基質による過酸化水素発生系を用いることもできる。このようなオキシダーゼの例は、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、ローアミノ酸オキシダーゼ、アリールアルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ソルボースオキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼなどがあり、特に好ましくはグルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼである。

【0024】また過酸前駆体は、反応性アシル基を有する有機化合物もしくはカルボン酸エステル、カルボン酸無水物、酢酸塩であり、このような物質にはT A E D

(tetraacetylenediamine)、T A M D (tetraacetylmethylenediamine)、T A G U (tetraacetylglucuril)、D A D H T (diacetyldioxohexahydrotriazine)、S N O B S (sodium nonanoyloxybenzene sulfonate)、I S O N O B S (sodium isononanoyloxybenzene sulfonate)、コハク酸無水物、安息香酸無水物、フタル酸無水物、P A G (glucose pentaacetate)、キシローステトラアセテートがあり、特に好ましくは、T A E D、S N O B Sである。さらに過酸は、例えばD P D D A (diperoxynonanedioic acid)、diperoxyisophthalic acid、magnesium monoperoxyphthalate hexahydrate、N A P A A (nonylamidoperoxyadipic acid)で

ある。

【0025】本発明のポリフェノールオキシダーゼは、様々な洗浄剤、洗剤、または界面活性剤と共に用いることができる。これにより、本発明のポリフェノールオキシダーゼを配合した洗浄剤または洗剤組成物が提供される。このような洗浄剤または洗剤組成物の代表例は、洗浄剤または洗剤組成物重量当たり10～50重量%の界面活性剤、0～50重量%のビルダー、1～50重量%のアルカリ剤あるいは無機電解質、0.1～10重量%の再汚染防止剤、酵素、漂白剤、蛍光染料、ケーキング防止剤及び酸化防止剤からなる群より選ばれる少なくとも1種以上の配合成分からなる洗浄剤または洗剤組成物が挙げられる。

【0026】界面活性剤としては石鹸、例えば直鎖または分岐アルキルあるいはアルケニル硫酸塩、アミド硫酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩のような脂肪族硫酸化物、アルキルスルホン酸塩、アミドスルホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸塩、 α -オレフィン、ビニリデン型オレフィン及び内部オレフィンの各スルホン酸塩のような脂肪族スルホン酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキルベンゼンスルホン酸塩のような芳香族スルホン酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテルカルボン酸塩またはアミド、 α -スルホ脂肪酸塩またはエステル、アミノ酸型界面活性剤、アルキルまたはアルケニル酸性リン酸エステル、アルキルまたはアルケニルリン酸塩のごときリン酸エステル系界面活性剤、スルホン酸型両性界面活性剤、ベタイン型両性界面活性剤、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテルあるいはアルコール、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、高級脂肪酸アルカノールアミドまたはそのアルキレンオキシド付加物、ショ糖脂肪酸エステル、脂肪酸グリセリンモノエステル、アルキルまたはアルケニルアミンオキシド、テトラアルキルアンモニウム塩型カチオン界面活性剤など洗剤組成物として通常配合される界面活性剤であればいずれも使用可能であり、陰イオン性界面活性剤の場合の対イオンとしてはナトリウムイオンまたはカリウムイオンであることが好ましい。これらの界面活性剤は、単独または2種以上の混合物として使用さ

れる。

【0027】ビルダー及びアルカリ剤あるいは無機電解質としてはオルソリン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリリン酸塩、メタリン酸塩、ヘキサメタリン酸塩、フィチン酸塩などのリン酸塩、エタン-1,1-ジホスホン酸及びその誘導体、エタンヒドロキシ-1,1,2-トリホスホン酸、エタン-1,2-ジカルボキシ-1,2-ジホスホン酸、メタンヒドロキシホスホン酸などのホスホン酸塩、2-ホスホノブタン-1,2-ジカルボン酸、1-ホスホノブタン-2,3,4-トリカルボン酸、 α -メチルホスホノコハク酸などのホスホノカルボン酸塩、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、ジエチレントリアミン五酢酸塩などのアミノポリ酢酸塩、ポリアクリル酸、ポリイタコン酸、ポリマレイン酸、無水マレイン酸共重合体、カルボキシメチルセルロース塩などの高分子電解質、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールなどの非解離高分子、ジグリコール酸、オキシジコハク酸、カルボキシメチルオキシコハク酸、グルコン酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、ショ糖、ラクトースなどのカルボキシメチル化物、ペンタエリスリトールのカルボキシメチル化物、グルコン酸のカルボキシメチル化物、ベンゼンポリカルボン酸、シュウ酸、リンゴ酸、オキシジコハク酸、グルコン酸などの有機酸塩、ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、炭酸塩、セスキ炭酸塩、硫酸塩、メタケイ酸塩などの無機塩をアルカリ金属塩として用いることができ、またデンプン、尿素などの有機物質及び塩化ナトリウム、ベントナイトなどの無機化合物を用いることができ、更には有機アルカリ剤としてトリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、トリイソプロパノールアミンなどを用いることができる。

【0028】本発明の洗剤組成物は、前述のごとく、界面活性剤、本発明のポリフェノールオキシダーゼ等を構成成分として含むが、その必要に応じて両性界面活性剤、例えばパーボレート、パーカーボネートなどの漂白剤、色素、ビルダー、例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなどの再汚染防止剤、ケーキング防止剤、酸化防止剤、例えば他のオキシダーゼやペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼなどのその他の酵素を必要に応じて含ませることができる。

【0029】本発明の洗剤組成物に酵素を配合するには如何なる方法をもって行ってもよいが、微粉末状で配合することは、洗剤取扱い時の発塵による洗剤使用者や洗剤工業における作業者の安全衛生上好ましいことではなく、溶液状態あるいはあらかじめ発塵性をおさえた形状に賦形しておくことが好ましい。この賦形は通常よく用いられるマルメ造粒、押し出し造粒、流動造粒、遠心流動造粒やその他の方法のいずれによるものであってもよ

く、本発明の洗剤組成物に配合する酵素の形状は特にこれらの方法によって賦形されたものに限定されるものではない。

【0030】脱リグニン、漂白を目的として、パルプ工程の一部において本発明の菌株を接種して本発明のポリフェノールオキシダーゼを生産せしめるか、もしくは直接本発明の酵素標品を添加して、チップや粗砕パルプ等に作用させるバイオパルピング、バイオ漂白が有用な用途分野に挙げられる。

【0031】ポリフェノールを構造部分に有する天然物として、フラボノイド系、キサントン系、メラニン系などの植物色素やリグニンが知られており、ポリフェノールオキシダーゼはこれらの天然物に対する酸化作用を有する。また、毒性が問題になっているジクロロフェノール、トリクロロフェノール等のAOXをもポリフェノールオキシダーゼは反応基質にできる。それ故に、例えばこれらの天然物や非天然物を含有する排水処理においても本発明のポリフェノールオキシダーゼは有用である。

【0032】また、本発明のポリフェノールオキシダーゼを用いるバイオセンサーは、本酵素の特性を反映して、弱酸性～弱アルカリ性域のpHを有する様々な水溶液、有機溶媒中の芳香族化合物をモニターするために用いることができ有用である。また、本発明のポリフェノールオキシダーゼにより発生するフェノキシラジカル反応性を利用して、弱酸性～弱アルカリ性のpH域において効率よく微生物やウィルスの殺菌や不活性化を行うことも可能である。つまり、ポリフェノールオキシダーゼの基質自体の殺菌性に加えて、酵素的に発生するフェノキシラジカルによってより強力な殺菌性を与えることが可能である。しかも、殺菌処理物がそののち人体に接触もしくは摂取される場合、もしくは環境中に放出される場合には、ポリフェノールオキシダーゼの基質は酸化によって毒性の軽減された物質に変わっているため、必要な時点での殺菌性とその後の安全性の双方を達成でき、有用性が高い。

【0033】また、ポリフェノールオキシダーゼにより発生するフェノキシラジカルやキノン類を利用したポリマー合成においても、本発明のポリフェノールオキシダーゼは有用である。さらには、カテコール類等の易酸化性のポリフェノールを含む物質群を酸化する場合、自動酸化反応と酵素触媒的なポリフェノールの酸化反応を同時に進行させることができるため、本発明のポリフェノールオキシダーゼの使用は、効率の良い酸化のために極めて有効である。

【0034】

【実施例】以下に本発明について代表的な例を示し、さらに具体的に説明する。ただし、これらは単なる例示であり、本発明はこれらにのみ限られるものではない。

【0035】実施例1：培養及び粗精製、濃縮

500ml容のフラスコを培養装置に用い、0.134

%Na₂HPO₄・12H₂O、0.03%KH₂PO₄、1%マルトース、1%ペプトン、0.1%酵母エキス、0.05%MgSO₄・7H₂O、0.1mM CuSO₄、1mM MnCl₂、2mM CaCl₂を含む100mlの培地に20%Na₂CO₃を加えてpHを7.8としたものに、パチルス・リケニホルミス SD3003（受託番号FERM P-15383）を接種し、50℃、16時間の振とう培養後、培養温度を35℃に下げ、さらに3日間の培養を行った。培養後、4℃での遠心分離により除菌された培養ブロスを得た。これをさらに精製、濃縮するためには硫酸分画が有効で、20～60%飽和硫酸濃度において大部分のポリフェノールオキシダーゼ活性を沈澱として回収することができた。得られた硫酸沈澱は10mM Bis-Tris-HClバッファー溶液（pH7.0）に対して透析を行い、さらに精製、濃縮するために限外ろ過膜を用い、分子量10,000～100,000の分画範囲に粗精製濃縮水溶液（800mU/ml）を得た。

【0036】実施例2：基質特異性

実施例1記載の粗精製濃縮水溶液を用いてポリフェノール化合物酸化反応の基質特異性を調べた。室温（20℃）において、0.05mMの基質と100mMBis-Tris-HClバッファー溶液（pH7.0）における酵素添加、無添加での酸素消費速度の差を測定することで行った。結果を表1に示した。

【0037】

【表1】

基質	酸化反応
シリンガルダジン	+
4-アニシジン	+
αフェニレンジアミン	+
フェルラ酸	+

【0038】実施例3：分子量

分子量測定は、GFC（ゲルろ過クロマトグラフィー）を用いて行った。1.34%Na₂HPO₄・12H₂O、0.3%KH₂PO₄、1%NaClによって流速1.0ml/minで平衡化したGFCカラム（Shodex PROTEINKW-802.5、2連）とUV検出器（280nm）を用いるHPLCにより、実施例1記載の粗精製濃縮水溶液の分析及び分取と活性測定を行ったところ、ポリフェノールオキシダーゼ活性ピークは分子量46,000～56,000の範囲に溶出された。なお、分子量マーカー蛋白質は、オリエンタル工業（株）のMW-Marker（HPLC）を用いた。

【0039】実施例4：5リッター培養槽での培養及び濃縮、粗精製

0.134%Na₂HPO₄・12H₂O、0.03%KH₂PO₄、1%マルトース、1%ペプトン、0.1%酵母エキス、0.05%MgSO₄・7H₂O、0.1mM CuSO₄、1mM MnCl₂、2mM C

aCl₂から成る3リッターの培地に10%NaOHを加えてpHを7.8としたものを含む5リッター培養槽に、パチルス・リケニホルミス SD3003（受託番号FERM P-15383）を接種し、50℃、16時間の振とう培養後、培養温度を35℃に下げ、さらに3日間の培養を行った。培養後、4℃での遠心分離により除菌された培養ブロスを得た。

【0040】次に、この培養ブロスの一部を、ミニタン・フィルターバケット（CAT.NO.: PTGCOMP04, ミリポア社製）を用いるミニタン限外ろ過システム（ミリポア社製）によって、分子量10,000以上の画分として濃縮した。さらにこの濃縮液は200ppmNH₄HCO₃に対して透析後、凍結乾燥に供し、粗精製物を凍結乾燥品として得た。凍結乾燥品のポリフェノールオキシダーゼ活性は500mU/mgであった。

【0041】実施例5：酵素含有洗剤による汚染布の処理

25重量%の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）、5重量%のポリオキシエチレンラウリルエーテル、15重量%のトリポリリン酸ナトリウム、6重量%のケイ酸ナトリウム、1重量%のカルボキシメチルセルロースナトリウム及び48重量%のNa₂SO₄からなる指標洗剤10グラムに、実施例4記載の凍結乾燥品を0.1グラム添加したものを酵素配合洗剤とし、凍結乾燥品を添加していないものを酵素非配合洗剤とした。また、木綿白布（5cm×5cm）の中央に100ppmエバンスブルー（和光純薬工業（株））0.2mlを加えることで汚染布を調製した。

【0042】次に、500ml容ビーカーに汚染布1枚と水10mlを加えた後、さらに酵素配合洗剤または酵素非配合洗剤を10mg添加し、12分間振とうすることで洗浄処理を行った。処理後の汚染布は、水洗、風乾し、色彩色差計（CR-200, MINOLTA 製）によってY, y, x値を測定し、さらに式[Z = (1 - x - y) Y / y]によってZ値を算出したところ、酵素配合洗剤は、酵素非配合洗剤に比べ、1.5ポイントの白色度向上を示した。

【0043】

【発明の効果】以上詳細に説明した通り、本発明によりバクテリアが生産するポリフェノールオキシダーゼが提供され、これを用いることにより酵素的酸化を達成し、ポリフェノール物質や着色物質の酸化処理や、洗浄、漂白といったポリフェノールオキシダーゼの利用に寄与できることが示された。また、本発明のポリフェノールオキシダーゼの製造方法により、本発明のポリフェノールオキシダーゼを効率よく製造できる。

【0044】また、本発明のパチルス・リケニホルミス SD3003は本発明のポリフェノールオキシダーゼの製造に有効である。また、本発明のポリフェノールオキシダーゼを用いることにより、有効な着色物質の処

理、紙、パルプもしくは繊維の処理、漂白処理、洗浄処理、または、微生物もしくはウィルスの処理等の方法が提供される。

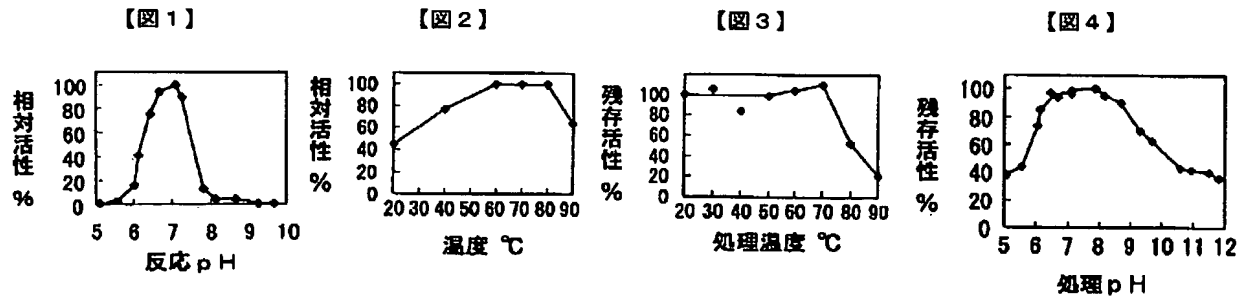
【図面の簡単な説明】

【図1】SD3003由来のポリフェノールオキシダーゼのpHプロファイル。

【図2】SD3003由来のポリフェノールオキシダーゼの温度プロファイル。

【図3】SD3003由来のポリフェノールオキシダーゼの温度安定性を示すグラフ。

【図4】SD3003由来のポリフェノールオキシダーゼのpH安定性を示すグラフ。



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:10)

(C 1 2 N 9/02

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:10)

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:07)